

МИКРОРИБОНУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ ПРИ УЛЦЕРОЗНИЯ КОЛИТ В ДЕТСКАТА ВЪЗРАСТ

Красимира Колева, Миглена Георгиева

*Втора детска клиника, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна
Катедра по педиатрия, Медицински университет – Варна*

MICRORIBONUCLEIC ACIDS IN CHILDREN WITH ULCERATIVE COLITIS

Krasimira Koleva, Miglena Georgieva

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

През последните години редица микрорибонуклеинови киселини (микроРНК) се използват като обещаващи неинвазивни биомаркери при пациенти с улцерозен колит. Количествените характеристики на експресията на 11 различни серумни микроРНК са изследвани с помощта на верижна полимеразна реакция в реално време при общо 33 деца. Касае се за 13 деца, 8 момичета и 5 момчета на възраст между 7 и 17 г. с улцерозен колит, и 20 здрави деца, 12 момичета и 8 момчета на възраст между 4 и 17 г. Експресията на всички микроРНК е по-висока при пациентите, отколкото при здравите деца. Средната стойност на експресията на микроРНК122 е с 3,76 пъти по-голяма при децата с улцерозен колит, отколкото при здравите деца, но разликата не е статистически значима ($t=1,73$; $p>0,05$). Някои микроРМНК играят диагностичната роля при децата с улцерозен колит, но са необходими по-нататъшни системни изследвания при пациентите с това заболяване в детската и зрялата възраст.

Ключови думи: улцерозен колит, микрорибонуклеинови киселини, деца

ABSTRACT

In recent years, several microribonucleic acids (microRNA) have been used as promising non-invasive biomarkers in patients with ulcerative colitis. Quantitative characteristics of the expression of 11 different serum microRNAs were examined by means of real-time polymerase chain reaction in a total of 33 children. There were 13 children, eight girls and five boys, aged between seven and 17 years with ulcerative colitis and 20 healthy children, 12 girls and eight boys aged between four and 17 years. All the microRNAs presented with a higher expression in patients than in healthy children. The mean value of microRNA122 expression was 3.76 times greater in children with ulcerative colitis than in healthy children, however, the difference was statistically insignificant ($t=1.73$; $p>0.05$). Some microRNAs play a diagnostic role in children with ulcerative colitis, however, further systematic research is needed for patients with this disease in childhood and adulthood.

Keywords: ulcerative colitis, microribonucleic acids, children

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се наблюдава стремително нарастване на медико-социалното значение на възпалителните чревни заболявания в детската възраст в целия свят. Те се характеризират с по-разпространено и по-тежко протичане, отколкото при възрастните болни (7). През периода между 1970 г. и 2018 г. се наблюдава по-висока заболяемост от улцерозния колит при децата в Северна Европа, отколкото в другите европейски страни (10). Заболяемостта нараства значително в Чешката република, Ирландия, Швеция и Унгария, а болестността варира между 8,3 и 30 на 100 000 души население.

Непрекъснато се предлагат модерни методи за прецизна диагностика на улцерозния колит както в зрялата възраст, така и при децата.

Микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) представляват клас от еднотелни, малки не-кодиращи РНК, които регулират генната експресия, действайки на мястото на взаимодействие между околната среда и унаследяемите молекулярни и клетъчни фенотипове (5). Докато до 2015 г. са известни повече от 2500 зрели човешки транскрипта на микроРНК (5), в началото на 2020 г. вече са познати повече от 5400 микроРНК, които имат за мишена множествени генни транскрипти (1).

Ние не установихме данни за проучвания от български автори, посветени на използването на микроРНК при деца с болестта на Крон. Поради това проведохме настоящото пилотно изследване с цел разкриване на количествените характеристики на 11 различни микроРНК при деца с това заболяване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Настоящото проучване е проведено през периода между 1.I.2018 г. и 31.XII.2019 г. Количествените характеристики на експресията на 11 различни серумни микроРНК (микроРНК122, микроРНК142-3p, микроРНК196-b, микроРНК642-b3, микроРНК155, микроРНК131-a, микроРНК125-a, микроРНК16-a, микроРНК21, микроРНК223 и микроРНК195) са изследвани с помощта на верижна полимеразна реакция в реално време в Лабораторията по нутригеномика, функционални храни и нутрацевтици при Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна. Касае се за общо 33 деца – за 13 деца, 8 момичета и 5 момчета на възраст между седем и 17 г. с улцерозен колит, хоспитализирани във Втора детска клиника на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна при Катедрата по педиатрия на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна и за 20 здрави деца, 12 момичета и 8 момчета на възраст между 4 и 17 г.

Получените данни са обработени статистически с помощта на вариационен анализ при уровен на значимост от $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Стойностите на тези 11 микроРНК при децата с улцерозен колит са показани на Табл. 1.

Всички микроРНК се характеризират с по-висока експресия при болните, отколкото при здравите деца. Поради сравнително малкия брой на изследваните пациенти и значителната дисперсия между най-ниските и най-високите стойности на тези микроРНК не се установяват статистически достоверни различия между болните и здравите деца. Средната стойност на експресията на микроРНК122 е с 3,76 пъти по-голяма при

Таблица 1. Стойности на 11 микроРНК при 13 деца с улцерозен колит

МикроРНК	средна стойност	стандартно отклонение	максимална стойност	минимална стойност
miRNA122	3,38	5,07	17,91	0,18
miRNA143-3p	1,49	1,42	4,01	0,11
miRNA196-b	1,69	1,45	4,24	0,19
miRNA642-3b	1,46	2,02	7,92	0,32
miRNA155	1,58	1,64	5,91	0,16
miRNA131-a	1,45	1,43	4,62	0,22
miRNA125-a	1,59	1,62	5,42	0,19
miRNA16-a	2,19	2,28	8,29	0,13
miRNA21	1,58	2,01	7,48	0,08
miRNA223	1,61	1,45	5,57	0,12
miRNA195	1,92	2,11	7,49	0,19

децата с улцерозен колит, отколкото при здравите деца, но разликата не е статистически значима ($t=1,73$; $p>0,05$).

ОБСЪЖДАНЕ

Напоследък се появили единични публикации от чужди автори, посветени на някои от тези микроРНК – микроРНК155, микроРНК223, микроРНК21, микроРНК195 и микроРНК122.

При изследването на 20 болни с улцерозен колит в активна фаза на заболяването и 16 контролни лица се установява повишена експресия на общо 33, а понижена експресия – на други 35 микроРНК (8). Резултатите от това изследване показват, че експресията на микроРНК155 е с 1,22 пъти по-висока при тези болни, отколкото при контролни лица ($p<0,03$). Тази микроРНК играе ключова роля при регулацията на пътищата на възпалението на червата и е насочена директно спрямо FOXO3a, намалявайки експресията му и активирайки сигналния път на нуклеарния фактор карпа-В.

МикроРНК155 стимулира значително клетъчната пролиферация и секрецията на провъзпалителните цитокини интерлевкин-6, тумор некротизиращ фактор- α , интерлевкин-1 β и интерферон- γ при експерименталния колит и инхибицията ѝ е обещаваща стратегия за лечение на улцерозния колит (6).

Експресията на микроРНК155 в чревната лигавица е значително по-силно изразена при болните с улцерозен колит, отколкото при контролните лица (15). Тя е по-висока във възпалената, отколкото в интактната чревна лигавица на деца с улцерозен колит в Унгария (2). При изследването на тази микроРНК в биопсии от дебелото черво при осем болни с улцерозен колит с ендоскопски доказана възпалена лигавица се установява различна пространствена експресия в сравнение с други осем болни с това заболяване, но без възпалена лигавица, и с осем контролни лица (12).

Експресията на микроРНК223 е повишена при улцерозния колит, а активността ѝ се регулира по сигналния път на интерлевкин-23 (13). Инхибицията ѝ посредством антагомир активира повторно клаудин-8 и подобрява симптоматиката на улцерозния колит.

Експресията на микроРНК223 в чревната лигавица е значително по-силна при болните с улцерозен колит, отколкото при контролните лица (15). Тя е с 2,8 пъти по-висока 50 болни с улцерозен колит, отколкото при 50 контролни лица в

Китай (14). Концентрацията ѝ корелира с показателите за тежестта на заболяването. Тя показва статистически достоверно по-високи стойности на корелационния коефициент на Spearman при болните спрямо СУЕ ($r=0,489$; $p<0,001$) и С-реактивния протеин с висока чувствителност ($r=0,545$; $p<0,001$).

При изследването на микроРНК223 в биопсии от дебелото черво при осем болни с улцерозен колит с ендоскопски доказана възпалена лигавица се установява различна пространствена експресия в сравнение с други осем болни с това заболяване, но без възпалена лигавица, и с осем контролни лица (12).

МикроРНК21 играе важна роля при регулацията на бариерната функция на интестиналния епител (16). При изследването ѝ при 30 болни с хроничен улцерозен колит се установява повишение на концентрацията ѝ както в лигавицата, така и в серума на болните. Акумулацията ѝ в епителните клетки *in vivo* е потвърдена чрез *in situ*-хибридизация. Повишената експресия на микроРНК21 нарушава целостта на плътните връзки в интестиналните епителни клетки, намалява трансепителното електрическо съпротивление и повишава пропускливостта за инулин.

Експресията на циркулиращата микроРНК21 е по-висока при 18 деца с улцерозен колит на средна възраст от $15,8\pm3,6$ г., отколкото при 20 здрави деца на средна възраст от $14,8\pm2,5$ г. (17). Експресията на тази микроРНК в чревната лигавица е значително по-силна при болните с улцерозен колит, отколкото при контролните лица (15).

Експресията на микроРНК195 в чревната лигавица е значително по-силна при болните с улцерозен колит, отколкото при контролните лица (15).

Експресията на микроРНК122 е по-ниска в макроскопски интактните участъци на дебелото черво при децата с улцерозен колит, отколкото при децата с болест на Крон в Унгария (2).

Бихме посочили и някои интересни изследвания върху други микроРНК с анализи при деца и възрастни болни с улцерозен колит.

При сравнителното изследване на няколко микроРНК в 28 проби от черва на деца се установява, че микроРНК27-а и микроРНК16 са подходящи за анализ при болните с улцерозен колит (3).

МикроРНК15-а и нейният прицелен ген цикъл 42 на клетъчното деление са изследвани при седем деца с улцерозен колит и 21 здрави деца (11). Експресията на микроРНК15-а нараства

($p=0,0038$), а тази на цикъла 42 на клетъчното деление намалява ($p=0,0013$) в клетките, стимулирани посредством тумор-некротизиращия фактор- α .

Профилът на експресия на микроРНК141 на 15 болни с активна форма на улцерозен колит е съпоставен с този на 13 здрави лица (4). Налице е съществено намаление на тази експресия при болните. От друга страна, повишената експресия понижава нивата на матриксната металопротеиназа-2 и матриксната металопротеиназа-9 в клетките HT29, третирани с тумор-некротизиращия фактор- α . Ролята на микроРНК-141 при възпалението на червата на тези болни е свързана с намалената експресия на хемокина CXCL5.

Пространствената експресия на микроРНК138 и на микроРНК125-b в биопсии от дебелото черво при осем болни с улцерозен колит с ендоскопски доказана възпалена лигавица е различна от тази при други осем болни с това заболяване, но без възпалена лигавица, и при осем контролни лица (12).

Експресията на циркулиращата микроРНК223-3р корелира с активността на улцерозния колит и е с по-голяма чувствителност и специфичност от С-реактивния протеин (9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тези наши резултати и данните от достъпната ни литература показват диагностичната роля на някои микроРНК при деца с улцерозен колит и необходимостта от системни изследвания при пациентите с това заболяване в детската и зрялата възраст.

ЛИТЕРАТУРА

1. Altaf-Ul-Amin M, Karim MB, Hu P, Ono N, Kanaya S. Discovery of inflammatory bowel disease-associated miRNAs using a novel bipartite clustering approach. *BMC Med Genomics*. 2020;13(Suppl 3):10. doi: 10.1186/s12920-020-0660-y.
2. Béres NJ, Szabó D, Kocsis D, Szűcs D, Kiss Z, Müller KE, et al. Role of altered expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(2):327-335.
3. Buonpane C, Ares G, Benyamen B, Yuan C, Hunter CJ. Identification of suitable reference microRNA for qPCR analysis in pediatric

inflammatory bowel disease. *Physiol Genomics*. 2019;51(5):169-175.

4. Cai M, Chen S, Hu W. MicroRNA-141 is involved in ulcerative colitis pathogenesis via aiming at CXCL5. *J Interferon Cytokine Res*. 2017;37(9):415-420.
5. Chapman CG, Pekow J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015;8(1):4-22.
6. Lu ZJ, Wu JJ, Jiang WL, Xiao JH, Tao KZ, Ma L, et al. MicroRNA-155 promotes the pathogenesis of experimental colitis by repressing SHIP-1 expression. *World J Gastroenterol*. 2017;23(6):976-985.
7. Malmberg P, Hildebrand H. The emerging global epidemic of paediatric inflammatory bowel disease - causes and consequences. *J Intern Med*. 2016;279(3):241-258.
8. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(4):652-659.
9. Polytarchou C, Oikonomopoulos A, Mahurkar S, Touroutoglou A, Koukos G, Hommes DW, et al. Assessment of circulating microRNAs for the diagnosis and disease activity evaluation in patients with ulcerative colitis by using the nanostring technology. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2533-2539.
10. Roberts SE, Thorne K, Thapar N, Broekaert I, Benninga MA, Dolinsek J, et al. A systematic review and meta analysis of paediatric inflammatory bowel disease incidence and prevalence across Europe. *J Crohns Colitis*. 2020 Feb 28. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa037.
11. Tang WJ, Peng KY, Tang ZF, Wang YH, Xue AJ, Huang Y. MicroRNA-15a - cell division cycle 42 signaling pathway in pathogenesis of pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018;24(46):5234-5245.
12. Valmiki S, Ahuja V, Paul J. MicroRNA exhibit altered expression in the inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *World J Gastroenterol*. 2017;23(29):5324-5332.
13. Wang H, Chao K, Ng SC, Bai AH, Yu Q, Yu J, et al. Pro-inflammatory miR-223 mediates the cross-talk between the IL23 pathway and the intestinal barrier in inflammatory

- bowel disease. *Genome Biol.* 2016;17:58. doi: 10.1186/s13059-016-0901-8.
14. Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, et al. Circulating microRNA223 is a new biomarker for inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2016a;95(5):e2703. doi: 10.1097/MD.0000000000002703.
15. Xu XM, Zhang HJ. miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World J Gastroenterol.* 2016;22(7):2206-2218.
16. Yang Y, Ma Y, Shi C, Chen H, Zhang H, Chen N, et al. Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(4):746-752.
17. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohns Colitis.* 2014;8(9):1108-1117.

Настоящото проучване е осъществено с финансовата подкрепа на проект № 18022 по фонд „Наука“ на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

Адрес за кореспонденция:
д-р Красимира Колева
Втора детска клиника
УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна
Катедра по педиатрия
Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Варна 9010
бул. „Христо Смирненски“ 1
тел. 0899929666
e-mail: krasi0617@abv.bg